

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. Dr. W. Neumann

GEFÄSS- UND HERZWIRKUNG
VON GASBRANDGIFT UND SEINEN KOMPONENTEN
(NACH UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN PRÄPARATEN)

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Horst Theodor Reuschel
aus Mainleus

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

Würzburg 1959

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. Dr. W. Neumann

GEFÄSS- UND HERZWIRKUNG
VON GASBRANDGIFT UND SEINEN KOMPONENTEN
(NACH UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN PRÄPARATEN)

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Horst Theodor Reuschel
aus Mainleus

Würzburg 1959

Referent: Privatdozent Dr. E. Habermann

Korreferent: Professor Dr. Dr. W. Neumann

Tag der Promotion: 24. 7. 59

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN UND MEINER SCHWESTER

IN DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
A Einleitung	1
B Methodik	3
I Froschgefäßpräparat nach LAEWEN und TRENDELENBURG ...	3
II Kaninchenohr nach KRAWKOW und PISSEMSKI	4
III Isoliert durchströmte hintere Körperhälfte der Ratte	5
IV Isoliert durchströmtes Rattenherz nach LANGENDORFF	6
C Ergebnisse	10
I Froschgefäßpräparat	10
a) Gesamtgift	
b) Gereinigte Komponenten	
II Kaninchenohr	13
a) Gesamtgift	
b) Gereinigte Komponenten	
III Isoliert durchströmte hintere Körperhälfte der Ratte	15
a) Gesamtgift	
b) Gereinigte Komponenten	
IV Isoliertes Rattenherz	18
a) Gesamtgift	
b) Gereinigte Komponenten	
D Besprechung	22
E Zusammenfassung	24
F Literaturnachweis	I

EINLEITUNG

Die Gasbranderreger zählen zu den wenigen Bakterienarten, deren lokal- und allgemeintoxische Wirkung durch die erwiesene Bildung echter Exotoxine erklärbar ist. Das für die Gasbrandinfektion des Menschen wichtige *Clostridium Welchii* Typ A (oder *perfringens*) gibt mehrere Wirkstoffe an seine Umgebung ab.

Seinem α -Toxin werden seit einiger Zeit, insbesondere aufgrund der Untersuchungen von MACFARLANE, mehrere pharmakologisch bzw. biochemisch wichtige Eigenschaften zugeschrieben: es spaltet als Phospholipase C aus Lecithin Phosphorylcholin ab, hämolysiert gewaschene Erythrozyten und wirkt schließlich allgemeintoxisch. Darüber hinaus erhöht es die Durchlässigkeit von Hautkapillaren (ELDER und MILES). Nach den mit verschiedener Methodik ausgeführten, aber zu im wesentlichen gleichen Resultaten führenden biochemischen Untersuchungen von ROTH und PILLEMER (1) sowie HABERMANN (1) bleiben die Relationen zwischen den verschiedenen α -Toxin-Aktivitäten bei chemischer Aufarbeitung konstant, d. h. es besteht kein Anhalt für eine eventuelle Uneinheitlichkeit des Toxins. Immunelektrophoretisch war das reinste bisher erhaltene α -Toxin-Präparat homogen (HABERMANN) (1).

Auch das β -Hämolysin (oder β -Toxin) wirkt, wie schon die beiden Bezeichnungen sagen, allgemeintoxisch und hämolytisch. Im Gegensatz zum α -Toxin konnte jedoch noch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, obgleich die hohe Aktivität pro Gewichtseinheit sowie das kinetische Verhalten (ROTH und PILLEMER) (2) des Toxins eine solche wahrscheinlich macht. β -Hämolysin wirkt in reduziertem Zustand über 10 mal stärker als in oxydiertem; infolgedessen fällt seine Wirksamkeit bei Kontakt mit aerobem biologischen Material rasch ab, wenn nicht unter Luftabschluß oder in Gegenwart reduzierender Verbindungen gearbeitet wird. So wird verständlich, daß β -Toxin lediglich am (anaeroben) Ort der Infektion, nicht aber über den Blutweg wirken kann. Es besteht kein Parallelismus zwischen

der β -Toxin-Produktion verschiedener Clostridienstämme und ihrer Allgemeintoxizität (EVANS); in der Flüssigkeit von Gasbrandblasen des Meerschweinchens konnte zwar α -Toxin, aber kein β -Toxin nachgewiesen werden (HABERMANN)(2).

Die beiden Enzyme Hyaluronidase und Collagenase, die sich ebenfalls in Kulturflüssigkeiten von Gasbranderregern finden, sind wohl für die lokale Gewebsschädigung durch Gasbrandgift von Bedeutung, dürften aber keine echten Toxine darstellen; denn sie sind weder lokal- noch allgemeintoxisch (HABERMANN)(2).

Über spezielle pharmakologische Wirkungen - mit Ausnahme der Hämolyse in vitro - ist sehr wenig bekannt. Auch über Blut- und Kreislaufveränderungen in vivo nach Injektion oder Infusion der beiden Toxine weiß man nur sehr wenig. Dem β -Toxin wird eine herzscheidigende Wirkung zugeschrieben (BERNHEIMER und CANTONI). Nach unveröffentlichten Untersuchungen von HABERMANN (3) schädigt aber auch α -Toxin das isolierte Froschherz derart, daß es in systolischen Stillstand gerät.

An isolierten glattnuskulären Organen erzeugt α - wie insbesondere β -Toxin Kontrakturen und bei höherer Dosis irreversible Schädigungen (HABERMANN)(3). Die allgemeine Zellschädigung äußert sich auch an den Gewebsmastzellen des Rattenmesenteriums in vitro, die durch α - und β -Toxin geschädigt werden, und in Histaminfreisetzung aus dem isolierten Rattenzwerchfell (HABERMANN)(3). Daß α -Toxin aufgrund seiner Phospholipaseaktivität auch partikelgebundene Enzyme bzw. Enzymsysteme zu inaktivieren vermag, ist nicht verwunderlich. So inaktiviert es die Bernsteinsäureoxydation (WOOLDRIDGE und HIGGINBOTTOM) und Gewebsthromboplastin (O'BRIEN), während β -Toxin hierzu nicht imstande ist (HABERMANN)(3).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Pharmakologie des Gasbrandgiftes und seiner Komponenten weiter geklärt werden, insbesondere seine Wirkung auf Gefäßgebiete, isoliert durchströmte Organe und Körperteile, sowie auf die Funktion des nach LANGENDORFF präparierten Rattenherzens.

METHODIK

I. FROSCHGEFÄSSPRÄPARAT NACH LAEWEN UND TRENDLENBURG

Prinzip dieser Methode ist die Durchströmung der Gefäße der hinteren Körperhälfte des Frosches mit physiologischer Salzlösung unter konstantem Druck, wobei die Ausflußgeschwindigkeit registriert wird. Eine Gefäßkontraktion ergibt also eine Verminderung der Tropfgeschwindigkeit, eine Vasodilatation eine Erhöhung derselben.

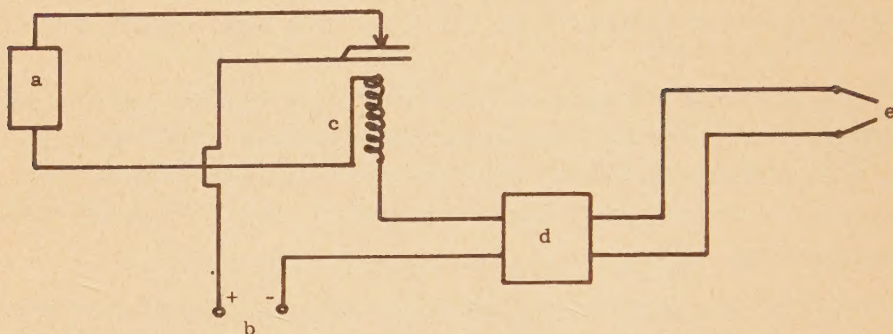
Die Bauchhöhle des Frosches (*rana temporaria*) wird eröffnet und die Bauchwand mit der auf ihrer Innenseite verlaufenden Vena abdominalis als ca. 2 cm breiter Lappen nach unten geschlagen. Die Blase wird vorsichtig bis zur Kloake freipräpariert, zusammen mit dem Rektum abgebunden und mit diesem entfernt. Sodann werden die aus den Femoralvenen aufwärts zur Nierengegend ziehenden Venae renales adheentes unterbunden und durchschnitten. Sämtliche Eingeweide werden bis herauf zum Herzen entfernt. An der dicht unterhalb des Herzens liegenden Teilungsstelle der Aorta wird eingeschnitten, eine stumpfe Kanüle bis in Höhe der Nieren vorgeschoben und dort fest eingebunden. Der Bauchlappen wird auf ein Tropfblech gelegt, auf dem sich die aus der Hinterextremität kommende Durchströmungsflüssigkeit ansammelt. Die Registrierung des durch die Tropfen erzeugten Schlußes zwischen zwei Platinelektroden erfolgt mittels Ordinatenschreibers (Fa. Braun, Melsungen) auf einer Rußtrommel. Die zu prüfende Substanz wird über ein Zweiweghahnssystem jeweils in Mengen von 1,5 ml in die zur Perfusion verwendete Kaltblütertyrode eingeschleust.

Als normaler Perfusionsdruck gelten im folgenden 40 cm Wassersäule, als erhöhter Druck 102 cm Wassersäule.

Nachstehende Skizze veranschaulicht die bei diesen Versuchen nötige Schaltung:

Abb. Nr. 1)

Schaltskizze zur Tropfenregistrierung.



a = Ordinatenschreiber, b = Batterie, c = Unterbrecherrelais, d = Elektronenrelais zur stromlosen Schaltung, e = Platinelektroden.

II. KANINCHENOHR NACH KRAWKOW UND PISSEMSKI

Gegenüber dem Froschpräparat besitzt das isolierte Kaninchenohr 2 Vorteile: einerseits enthält es fast nur Hautgefäße, andererseits ist das Gewebe sehr derb und daher die Neigung zu Ödembildung gering. Daraus ergibt sich, daß dieses Präparat im Gegensatz zum Frosch über längere Zeit als Versuchsobjekt brauchbar bleibt. SILBER weist darauf hin, daß ein Kaninchenohr nicht gefroren aufbewahrt werden darf, weil dadurch seine Reaktionsfähigkeit irreversibel geschädigt wird. Seine Präparate litten aber auch schon bei Aufbewahrung im Eisschrank.

Nach Isolierung des Ohres wird mit einer Injektionskanüle in die Arteria auricularis posterior eingegangen, die leicht zwischen den beiden Knorpelprominenzen an der Ohrbasis aufzufinden ist. Diese Arterie läuft zur Ohrspitze, wobei sie in ein feines Kapillarnetz übergeht. Der venöse Abfluß wird durch die beiden Randvenen und die Zentralvene des Ohres gebildet.

Sammlung der herausströmenden Flüssigkeit, Registrierung der Tropfen

und Einstellung des Druckes erfolgen auf gleiche Weise wie beim Frosch. Als Durchströmungsflüssigkeit wird eine Tyrodelösung folgender Zusammensetzung verwendet:

Stammlösung I:

Kaltblüter:

150,0 g NaCl

5,0 g KCl

5,0 g CaCl_2

0,3 g MgSO_4

gelöst in 1 000 ml aq. dest.

Warmblüter:

200,0 g NaCl

5,0 g KCl

5,0 g CaCl_2

0,3 g MgSO_4

Stammlösung II (sie ist für beide Präparate gleich):

25,00 g NaHCO_3

1,25 g NaH_2PO_4

gelöst in 500 ml aq. dest.

Von Stammlösung I werden 80 ml in 920 ml aq. dest. gegeben, von Stammlösung II 40 ml in 960 ml aq. dest. Diese Lösungen werden nun vorsichtig gemischt und 2 g Traubenzucker zugefügt.

III. ISOLIERT DURCHSTRÖMTE HINTERE KÖRPERHÄLFTE DER RATTE

Die Versuchsanordnung ist im Prinzip die gleiche wie beim Froschpräparat. Nach Unterbindung von Darm, Mesenterium und Nierengefäßen werden sämtliche Eingeweide entfernt. Eine längere Kanüle wird in die vor der Wirbelsäule verlaufende Aorta eingebunden. Dann wird die gesamte vordere Körperhälfte abgeschnitten und die aus der Schnittfläche, insbesondere der Vena cava caud., austretende Durchströmungsflüssigkeit (Warmblüter - Tyrode) wie bei den anderen Versuchen registriert.

IV. ISOLIERT DURCHSTRÖMTES RATTENHERZ NACH LANGENDORFF

Die Lebenderhaltung des isoliert durchströmten Warmblüterherzens ist weitaus schwieriger als die des Kaltblüterherzens. Schon die Vielzahl der angegebenen Methoden und Verbesserungen läßt darauf schließen. Die Organe des Kaltblüters sind resistenter als die des Warmblüters; außerdem wird der Herzmuskel des Frosches von der Herzhöhle aus durch die zwischen die Muskelbalken sich erstreckenden Spalten ernährt, während zur Versorgung des Herzmuskels der Säugetiere das Coronarsystem intakt sein muß.

Das Prinzip der auch von uns angewandten LANGENDORFF'schen Methode besteht darin, daß Blut oder die zur Erhaltung der Herztätigkeit geeignete Flüssigkeit durch eine in den Anfangsteil der Aorta eingebundene Kanüle herzwärts gepreßt wird. Die Aortenklappen schließen sich, und die Flüssigkeit muß ihren Weg durch die Kranzarterien nehmen; nach Durchlaufen des Coronargefäßsystems fließt sie aus dem eröffneten rechten Vorhof ab. Die Herzkammern bleiben dauernd leer.

Die Nährlösung muß unter möglichst konstanten Bedingungen zum Präparat gelangen, da das isoliert lebende Säugetierherz jede auch noch so kleine Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Durchspülungsflüssigkeit sofort mit einer Änderung seiner Tätigkeit beantwortet. Temperatur, hydrostatischer Druck, osmotischer Druck, pH-Wert, Ionenkonzentration und Sauerstoffgehalt müssen konstant bleiben.

Für die Versuche am Rattenherzen wurde von UHLMANN und NOBILE eine Nährlösung folgender Zusammensetzung empfohlen:

17,20 g NaCl	
0,60 g KCl	auf 1900 ml aq. dest.
0,48 g CaCl_2	
2,0 g Glukose	
0,7 g NaHCO_3	auf 100 ml aq. dest.

Die Bikarbonatlösung wird getrennt zubereitet und unter Umrühren der übrigen Lösung zugesetzt; sie erzeugt andernfalls einen Niederschlag von CaCO_3 , der sich nur langsam beim Durchleiten von kohlensäurehaltigem Gasgemisch löst.

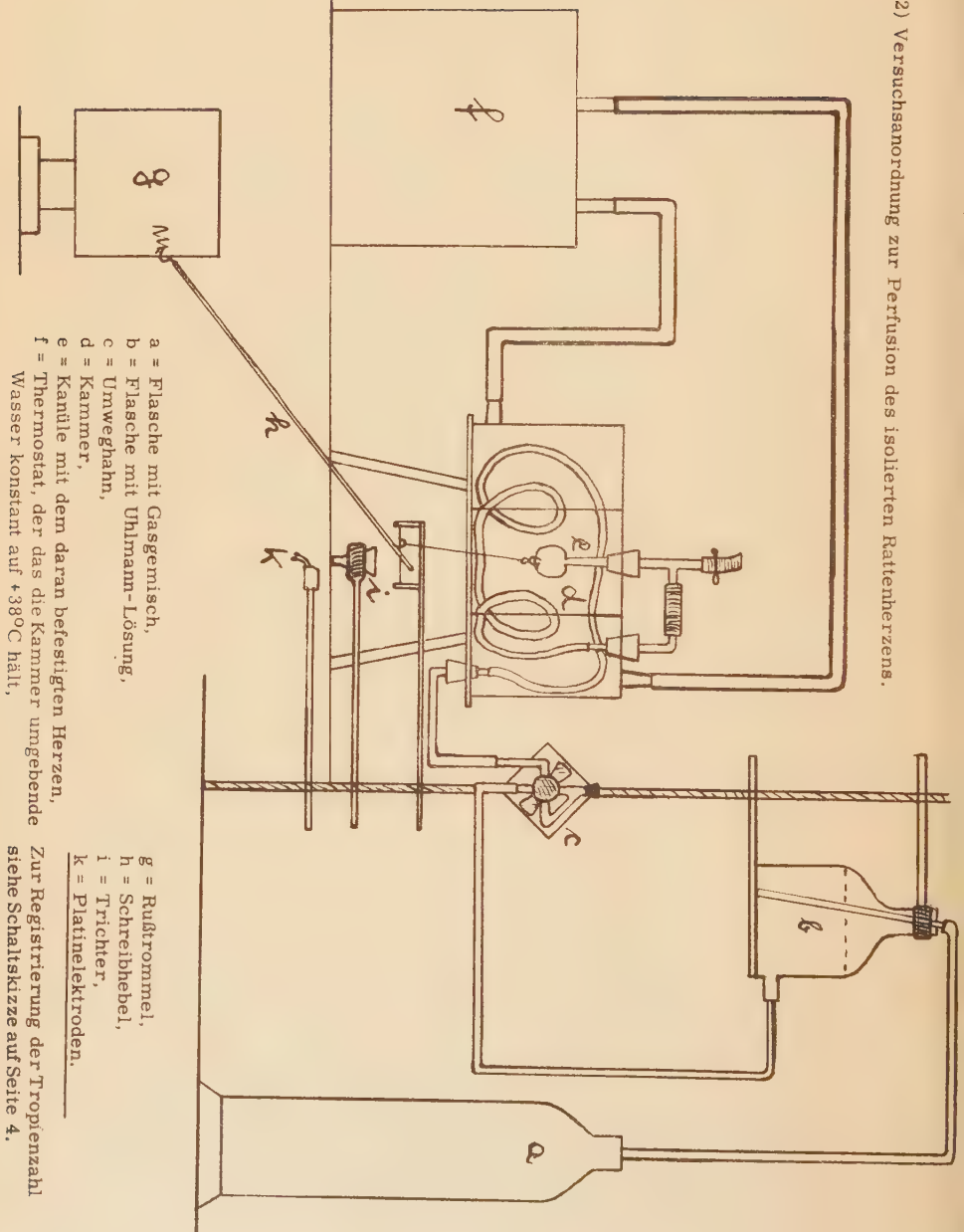
Das fertige Gemisch wird vor und während des Versuches mit einem Kohlensäure(5%)- Sauerstoff(95%)-Gemisch durchströmt.

Das schnell herauspräparierte Herz wird in kalte Uhlmann-Lösung (ca. $+4^{\circ}\text{C}$) gelegt und der Stillstand abgewartet. Dann wird eine Glaskanüle in die Aorta, nicht ganz bis in Höhe der Klappen, geschoben und eingebunden. Der rechte Vorhof wird durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Dann wird die Kanüle mit dem daran befestigten Herzen in eine durch einen Wassermantel auf 38° temperierte Kammer gebracht. Durch eine kleine Öffnung in ihrem Dach wird der Stopfen mit der Herzkannüle gesteckt. Nach unten ist die Kammer offen und nach vorne mit einem abnehmbaren Deckel abgeschlossen. Die mit dem Gasgemisch gesättigte Nährlösung wird vor Erreichen des Herzens durch einen im Heizmantel der Kammer liegenden Schlauch geleitet und somit auf Körpertemperatur gebracht. Die Herzspitze wird mit einer Klemme gefaßt und mittels Faden mit einem Schreibhebel verbunden, der die Muskelkontraktionen auf einen Rußkymographen überträgt. Die aus dem Herzen tropfende Flüssigkeit wird in einem Trichter gesammelt und auf die früher beschriebene Art registriert.

Die Lebensdauer gut präparierter Herzen liegt, wie Kontrollen zeigten, über einer Stunde.

Nachfolgendes Schema veranschaulicht obige Versuchsanordnung.

Abb. 2) Versuchsanordnung zur Perfusion des isolierten Rattenherzens.



V. SUBSTANZEN

- 1) Gesamtgift (entspricht der Fraktion PI von ROTH und PILLEMER (1, 2)
bzw. HABERMANN(1))

3,93 mg	Protein-Hydrochlorid pro ml		
200	Lecithinaseeinheiten	"	"
500 000	φ -Toxin Einheiten	"	"

- 2) α -Toxin

- a) in Lösung nach Elektrophorese und Chromatographie
(vgl. HABERMANN(1))

70 000	Hämolysin-Einheiten pro ml		
350	Lecithinase-Einheiten	"	"
0,2 mg	Stickstoff	"	"

- b) nach zusätzlicher Gefriertrocknung:

Aktivität und Reinheitsgrad wie bei HABERMANN(1)

330 000 α -Hämolysen-Einheiten / mg Stickstoff

1 880 Lecithinase-Einheiten / mg Stickstoff

α -Hämolysen / Lecithinase 175

- 3) φ -Toxin

- a) in Lösung nach Elektrophorese und Chromatographie
(vgl. HABERMANN(1))

100 000 φ -Einheiten pro ml

- b) nach zusätzlicher Gefriertrocknung:

Aktivität und Reinheitsgrad wie bei HABERMANN(1)

Die φ -hämolysische Aktivität am Wirksamkeitsmaximum beträgt
445 000 Einheiten pro mg Protein, oder - bei einem Umrechnungsfaktor von 6,25 - rund 2 800 000 Einheiten pro mg Stickstoff.

- 4) Collagenase (in Lösung nach Elektrophorese)

ca 100 Einheiten pro ml

- 5) Hyaluronidase (in Lösung nach Elektrophorese)

ca 1 000 Einheiten pro ml.

ERGEBNISSE

1) FROSCHGEFÄSSPRÄPARAT:

a) Gesamtgift (kurz PI genannt) wurde in verschiedenen Konzentrationen an drei Tieren getestet.

Versuch 1)

Nach PI 1/1000 keine Wirkung; nach PI 1/100 Vasokonstriktion. Durch Druckerhöhung läßt sich die Tropfenzahl fast bis auf den Ausgangswert steigern. Nochmals PI 1/100 ergibt starke, irreversible Kontraktion der Gefäße (siehe Abb. 3).

Abb. 3)

Gesamtgift am Froschpräparat.

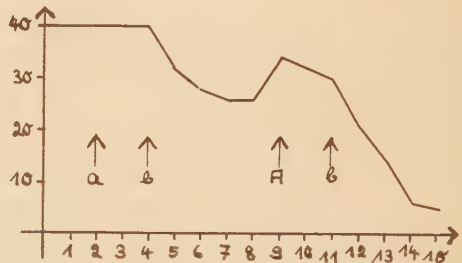
Ordinate: Tropfenzahl;

Abszisse: Zeit in Minuten.

a = PI 1/1000

b = PI 1/100

A = Druck erhöht



Versuch 2)

Nach der ersten Gabe von PI 1/1000 Vasodilatation,

" " zweiten " " PI 1/1000 schwache Kontraktion

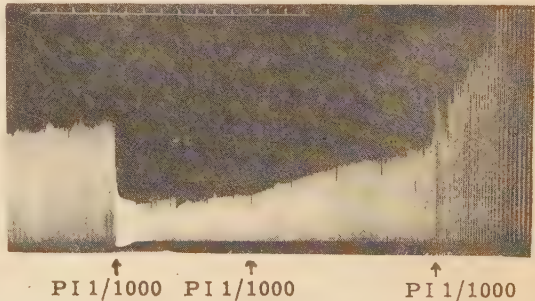
" " dritten " " PI 1/1000 starke Kontraktion, die auch durch Nachwaschen mit Tyrodelösung nicht aufgehoben werden kann (der Druck würde hierzu allerdings nicht erhöht)(vgl. Abb. 4).

Abb. 4)

Gesamtgift am

Froschpräparat.

Zeitschreibung: 30 sec.



Versuch 3)

P I 1/1000 führt zu (langsam eintretender), starker, irreversibler Kontraktion der Gefäße (siehe Abb. 5).

Abb. 5)

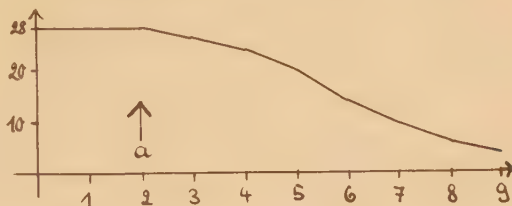
Gesamtgift am Froschpräparat

Ordinate: Tropfenzahl;

Abszisse:

Zeit in Minuten

a = P I 1/1000



Gasbrandgesamtgift besitzt also starke Gefäßwirkungen am Froschpräparat. In niedrigen Konzentrationen kann es die Gefäße erweitern, an anderen Präparaten oder bei höheren Konzentrationen steht die Vasokonstriktion im Vordergrund, die bei zunehmender Giftkonzentration oder wiederholter Giftgabe irreversibel wird. Dabei dürfte nicht nur eine Erregung der kontraktiven Gefäßbestandteile von Bedeutung sein, sondern auch das sich während sämtlicher Versuche schnell ausbildende Ödem.

b) Gereinigte Komponenten

α -Toxin (in Lösung)

Versuch 1) und 2)

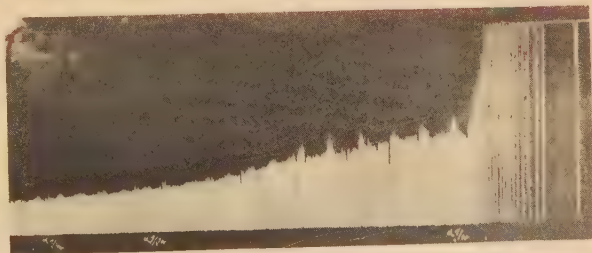
0,105 und 1,05 Lecithinase-Einheiten bleiben wirkungslos; 10,5 Lecithinase-Einheiten scheinen den Durchfluß allmählich zu mindern, doch halten wir dies nicht für signifikant.

Versuch 3)

0,53 und 5,3 Lecithinase-Einheiten führen zu keiner wesentlichen Änderung der Perfusionsgeschwindigkeit; 53 Lecithinase-Einheiten bewirken eine abrupt eintretende, starke, irreversible Kontraktion (siehe Abb. 6).

Abb. 6)

α -Toxin am Froschpräparat.



0,53

5,3

53

Lecithinase-Einheiten

α -Toxin besitzt zweifellos eine deutliche Gefäßwirkung; doch ist der Effekt des Gesamtgiftes nur zum kleinsten Teil auf diese Komponente zurückzuführen. Die Applikation der sicher wirksamen P I Dosis 1/1000 würde 0,3 Lecithinase-Einheiten entsprechen; gereinigtes Material dieser Aktivität ist jedoch gänzlich wirkungslos.

ϑ -Toxin (in Lösung)

ϑ -Toxin wirkt in reduziertem Zustand 1 - 2 Zehnerpotenzen stärker hämolytisch als in oxydiertem. Es war daher zu prüfen, ob eine eventuelle Gefäßwirkung von ϑ -Toxin durch Vorinkubation mit dem reduzierenden Cystein beeinflusst wird.

Versuch 1) und 2) (unreduziertes Material):

150 und 1500 Einheiten wirken nur angedeutet, 15000 Einheiten führen zu starker, irreversibler Vasokonstriktion und zu beträchtlichen Muskelfibrillationen (vgl. Abb. 7).

Abb. 7)

ϑ -Toxin (unreduziert)

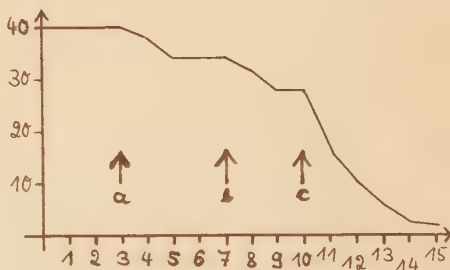
am Froschpräparat.

Ordinate: Tropfenzahl;

Abszisse: Zeit in Minuten;

a = 150 E; b = 1500 E;

c = 15000 E.



Versuch 3)

Eine 0,1%ige mit NaOH neutralisierte Cysteinlösung in Tyrode wird mit verschiedenen Verdünnungen von ϑ -Toxin zu gleichen Teilen gemischt und 10 Min. lang im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

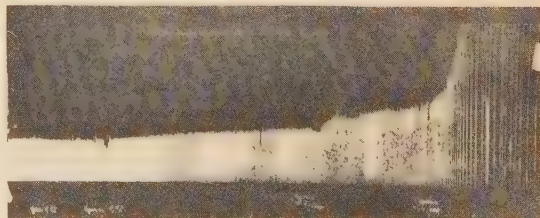
0,1%ige Cysteinlösung allein ändert die Perfusionsgeschwindigkeit nicht. 75 ϑ -Toxin-Einheiten wirken nur schwach, 750 Einheiten dagegen führen zu starker, mehrphasischer Kontraktion, die sich als irreversibel erweist. Gleichzeitig sind Muskelfibrillationen wie bei Applikation von 15000 unreduzierten ϑ -Einheiten zu beobachten (vgl. Abb. 8).

Abb. 8)

ϑ -Toxin (reduziert)

am Froschpräparat.

Zeitschreibung: 30 sec.



75

750

ϑ - Einheiten

$\sqrt[3]{V}$ -Toxin wirkt also in reduziertem Zustand sehr viel stärker, als in unreduziertem. Die Schwelle scheint bei 75 (reduzierten) $\sqrt[3]{V}$ -Einheiten zu liegen. Die Schwelle von unreduziertem Gesamtgift lag auf seinen Gehalt an $\sqrt[3]{V}$ -Einheiten bezogen bei 750 Einheiten. Die Wirkung des Gesamtgiftes dürfte also zum großen Teil auf seinem Gehalt an $\sqrt[3]{V}$ -Toxin beruhen.

Hyaluronidase (1,5 - 150 Einheiten) und Collagenase (0,15 - 15 Einheiten) waren beide am Froschpräparat unwirksam.

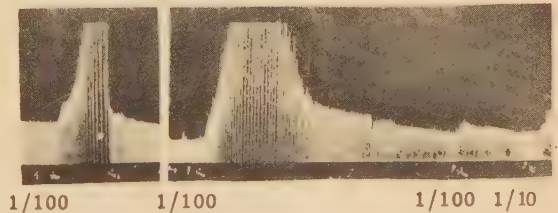
II) KANINCHENOHR

a) Gesamtgift

Versuch 1)

P I 1/1000 (2 mal) ohne Wirkung; P I 1/100 ergibt starke biphasische Kontraktion, die durch Druckerhöhung zu überwinden ist. Erneute Gabe von P I 1/100 erzielt gleiche Wirkung trotz Druckerhöhung. Nach einigen Minuten läßt die Wirkung nach; auf eine dritte Gabe von P I 1/100 tritt nur eine schwache, reversible Kontraktion ein. Eine erste Dosis von P I 1/10 ergibt eine kurzdauernde, starke Gefäßverengung; auf eine wiederholte Gabe von P I 1/10 zeigt sich keine Reaktion, ebenso nicht auf Adrenalin 1/10000; das Präparat ist also desensibilisiert (siehe Abb. 9)

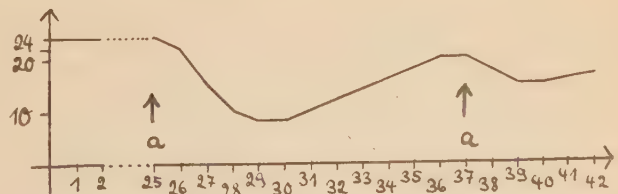
Abb. 9)
Gesamtgift am
Kaninchenohr



Versuch 2)

Niedrige Tropfgeschwindigkeit trotz erhöhten Druckes (24 pro Min.). P I 1/1000 (2 mal) zeigt keine Reaktion, P I 1/100 (2 mal) ebenso; P I 1/10 ergibt starken, reversiblen Effekt. Eine zweite Gabe von P I 1/10 führt zu nochmaliger schwächerer Kontraktion (ebenfalls reversibel) (siehe Abb. 10)

Abb. 10)
Gesamtgift am
Kaninchenohr.
Ordinate: Tropfen-
zahl; Abszisse:
Zeit in Minuten
a = P I 1/10



Die Wirkung von Gasbrandgesamtgift scheint an diesem Versuchsobjekt stark zu schwanken: einerseits führen wiederholte Gaben zur Wirkungsabschwächung, andererseits wechselt offenbar die Empfindlichkeit von Ohr zu Ohr (vgl. Versuch 1 mit 2), ähnlich wie dies auch schon bei den Experimenten von SILBER der Fall war. Gesichert erscheint jedoch, daß Gesamtgift in geeigneter Konzentration eine starke Gefäßverengung hervorrufen kann.

b.) Gereinigte Komponenten

α - Toxin

Versuch 1) α - Toxin

Das Präparat lag mehrere Stunden im Kühlschrank. Druck erhöht; Tropfgeschwindigkeit hoch (50 pro Minute). Während 0,53 und 5,3 Lecithinase-Einheiten unwirksam waren, führten 53 Einheiten zu langdauernder Kontraktion bei erstmaliger Gabe; eine zweite gleiche Dosis ergab eine zusätzliche geringe reversible Kontraktion von nur kurzer Dauer. (siehe Abb. 11)

Abb. Nr. 11)
 α -Toxin am
Kaninchenohr.



0,53 5,3 53 53

Lecithinase-Einheiten

Versuch 2) δ -Toxin

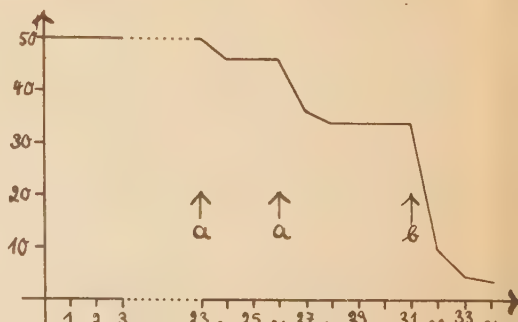
Das Präparat lag eine Nacht im Kühlschrank. Bei erhöhtem Druck zeigte es eine hohe Tropfgeschwindigkeit (50 pro Min.). Zur Prüfung der Reaktionsfähigkeit werden 0,15 γ Histamin appliziert, worauf sich eine deutliche reversible Kontraktion zeigt. Gaben von 75 bzw. 750 δ -Einheiten mit Cystein bleiben wirkungslos, zweimalige Zufuhr von 7500 δ -Einheiten mit Cystein ergibt das erste Mal eine geringe, das zweite Mal eine stärkere, offenbar nicht reversible Wirkung. Histamin (0,15 γ) bleibt wirksam (starker Effekt). (Abb. 12)

Abb. 12)

δ -Toxin (reduziert) am
Kaninchenohr. Ordinate:
Tropfenzahl; Abszisse:
Zeit in Minuten.

a = 7500 E;

b = 0,15 γ Hi.



Versuch 3) Hyaluronidase und Collagenase

Beide Enzyme werden am gleichen Präparat getestet. Verdünnungen wie bei den Versuchen am Froschpräparat bleiben ohne jeden Effekt, während 0,15 γ Histamin zu starker Konstriktion Anlaß geben. Druck normal.

α -Toxin wie γ -Toxin verengen die Gefäße des isoliert durchströmten Kaninchenohres, während Hyaluronidase und Collagenase unwirksam sind. Die quantitative Beziehung zur Wirkung des Gesamtgiftes läßt sich wegen der stark wechselnden Ansprechbarkeit der Ohren noch nicht festlegen.

III. ISOLIERT DURCHSTRÖMTE HINTERE KÖRPERHÄLFTE DER RATTE

a) Gesamtgift

Versuch 1)

Während P I 1/1000 wirkungslos blieb und eine erste Dosis von P I 1/100 nur eine gewisse Unruhe in das Kurvenbild brachte, führte eine zweite gleichstarke Gabe zu intensiver, nicht reversibler Kontraktion (siehe Abb. 13)

Abb. 13)

Gesamtgift an der hinteren Körperhälfte der Ratte. Ordinate: Tropfenzahl; Abszisse: Zeit in Minuten.
a = P I 1/100

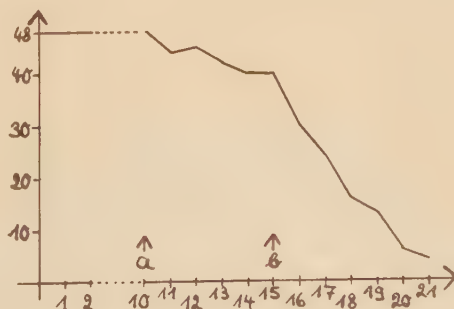


Versuch 2)

P I 1/100 (2 mal) nur fragliche Wirkung, P I 1/10 starke Kontraktion (siehe Abb. 14).

Abb. 14)

Gesamtgift an der hinteren Körperhälfte der Ratte. Ordinate: Tropfenzahl; Abszisse: Zeit in Minuten.
a = P I 1/100;
b = P I 1/10.

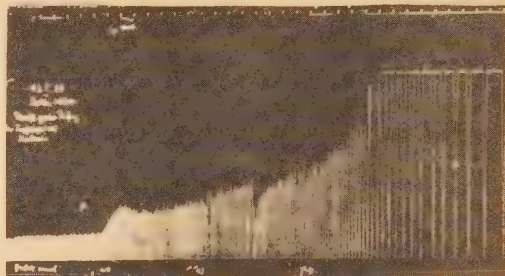


Versuch 3)

Eine erste Dosis von P I 1/100 ruft mehrphasische Kontraktion hervor, die durch eine zweite gleiche Gabe verstärkt wird und durch Druckerhöhung nicht zu durchbrechen ist (siehe Abb. 15). Die perfundierte Flüssigkeit wurde zwecks Prüfung auf Histamin gesammelt.

Abb. 15)

Gesamtgift an der hinteren Körperhälfte der Ratte.
Zeitschreibung: 30 sec.



1/100

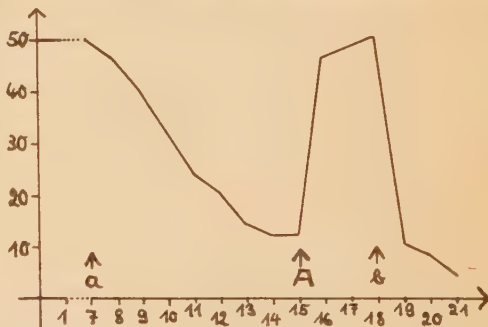
1/100

Versuch 4)

Während P I 1/1000 wirkungslos ist, ergibt Zusatz von P I 1/100 starke Kontraktion, die durch Druckerhöhung überwunden werden kann. P I 1/10 erzielt erneut eine starke, irreversible, biphasische Kontraktion. (vgl. Abb. 16). Die Tropfflüssigkeit wurde zur Prüfung auf Histamin gesammelt.

Abb. 16)

Gesamtgift an der hinteren Körperhälfte der Ratte.
Ordinate: Tropfenzahl;
Abszisse: Zeit in Minuten.
a = P I 1/100;
b = P I 1/10;
A = Druckerhöhung.



b) Gereinigte Komponenten (gefriergetrocknet)

Versuch 1) α - Toxin

0,3 - 30 γ α - Toxin sind auch bei wiederholter Applikation wirkungslos, 50 γ rufen einen fraglichen Effekt hervor. Höhere Konzentrationen standen bei der Ausführung dieser Versuche nicht zur Verfügung. Die Perfusionsflüssigkeit wurde zur Prüfung auf Histamin gesammelt.

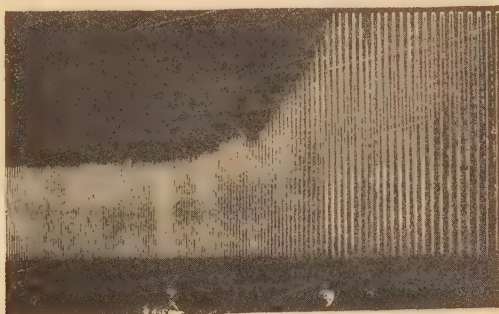
Versuch 2) und 3) β - Toxin

Während bei einem Perfusionsversuch 0,3 - 30 γ β - Toxin wirkungslos sind, führen schließlich bei einem zweiten 300 γ unreduziertes Toxin zu

starker, irreversibler, biphasischer Konstriktion. Zuvor waren auch hier 3 und (mehrmals) 30 γ wirkungslos geblieben. Die Durchströmungsflüssigkeit wurde zur Prüfung auf Histamin gesammelt (siehe Abb. 17).

Abb. 17)

γ -Toxin an der hinteren
Körperhälfte der Ratte



300 γ

Die isoliert durchströmte hintere Körperhälfte der Ratte reagierte also in 3 von 4 Versuchen nach Applikation von Gesamtgift in 100-facher Verdünnung mit Gefäßverengung. Gereinigtes γ -Toxin war in unreduziertem Zustand verhältnismäßig schwach wirksam, bei α -Toxin konnten eventuell wirksame Konzentrationen nicht getestet werden. Die Wirkung des Gesamtgiftes kann also ebensowenig wie am Froschpräparat auf α -Toxin bezogen werden; γ -Toxin wäre als wirksames Agens des Gesamtgiftes diskutabel, doch wurde es in reduziertem Zustand von uns nicht untersucht.

Zur Prüfung der Frage, ob die vasokonstriktorische Wirkung des Gasbrandgiftes und seiner α - und γ -Fraktion auf Freisetzung von Histamin beruhe, wurden kontinuierlich jeweils 5 ml der aus dem Präparat tropfenden Flüssigkeit aufgefangen und bei niedriger Temperatur aufbewahrt. Vor einer Gabe von Toxin wurde eine bestimmte Flüssigkeitsmenge zur Ermittlung des Leerwerts gesammelt. Die Auswertung erfolgte am isolierten Meerschweinchendarm mit Histamin als Bezugsubstanz. Als spezifischer Hemmstoff diente das Antihistaminicum Avil (Hoechst) in Mengen von 1 γ / 20 ml Badflüssigkeit.

Die Untersuchung zeigte, daß Histamin in die Perfusionsflüssigkeit abgegeben wird. Abb. 18 veranschaulicht die Zunahme des Histamingehaltes nach γ -Toxingabe. Nach α -Toxin fanden sich nur Spuren von Histamin, so daß von einer graphischen Darstellung abgesehen wurde.

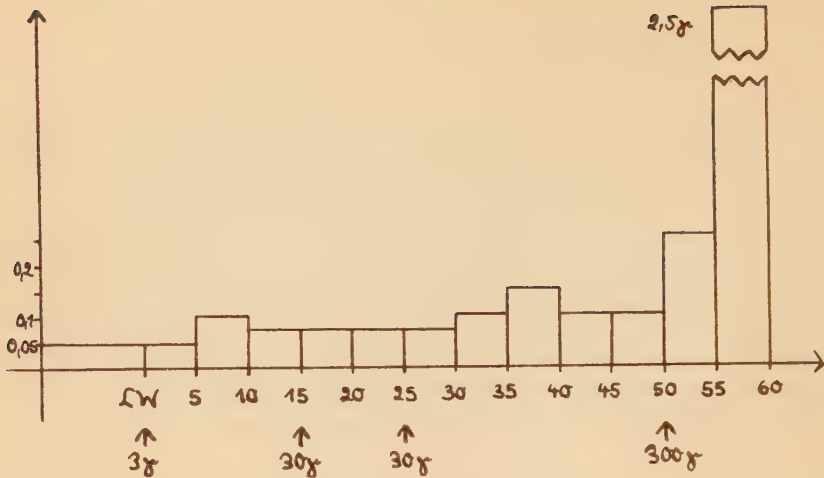


Abb. 18) Histamingehalt der Tropfflüssigkeit.
Ordinate: Histamin in γ /ml.
Abszisse: Tropfflüssigkeit in ml.

IV. ISOLIERTES RATTENHERZ

Es wurden stets zwei Funktionen registriert, die Hubhöhe und die Tropfen-
zahl, beides in Abhängigkeit von der Zeit.

a) Gesamtgift

Versuch 1)

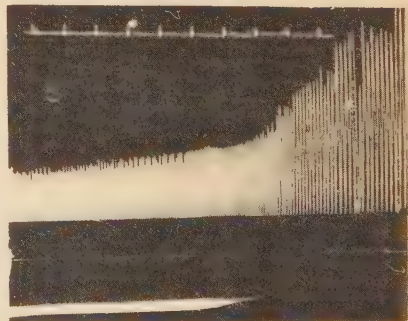
P I 1/1000 ändert weder Tropfgeschwindigkeit noch die kontraktile Funk-
tion in signifikanter Weise, P I 1/100 erzeugt einen ziemlich abrupt
eintretenden systolischen Stillstand des Herzmuskels mit starker Koronar-
verengung. (vgl. Abb. 19)

Abb. 19)

Gesamtgift am Rattenherz.

Obere Kurve: Koronardurchfluß;
untere Kurve: Amplitude des
Herzschlages.

Zeitschreibung: 30 sec.



Versuch 2)

Nach P I 1/1000 zeigt sich auch hier keine wesentliche Änderung der Muskeltätigkeit; der Koronardurchfluß wird verlangsamt (Kontraktion der Gefäße). Nach P I 1/100 treten Bradykardien auf, denen dann ein systolischer Stillstand folgt. Dabei nimmt die Tropfgeschwindigkeit stark ab und erreicht fast den Wert Null.

b) Gereinigte Komponenten (gefriergetrocknet)

α -Toxin

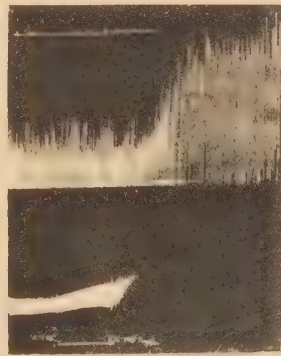
Bei 3 Versuchen wurde α -Toxin in Mengen von 0,3 - 30 γ appliziert, ohne daß eine signifikante Wirkung auf Herzschlag und Koronardurchfluß zu beobachten gewesen wäre. Auf eine Beschreibung im einzelnen kann daher verzichtet werden.

Versuch 4)

Bei Applikation von 15 γ läßt sich am Muskel eine beginnende Kontraktur erkennen, der Koronardurchfluß bleibt unverändert; 150 γ führen zu systolischem Herzstillstand und zu starker Kontraktion der Kranzgefäße. (siehe Abb. 20)

Abb. 20)

α -Toxin am Rattenherz.
Obere Kurve:
Koronardurchfluß; untere
Kurve: Amplitude des Herzschlages.
Zeitschreibung: 30 sec.



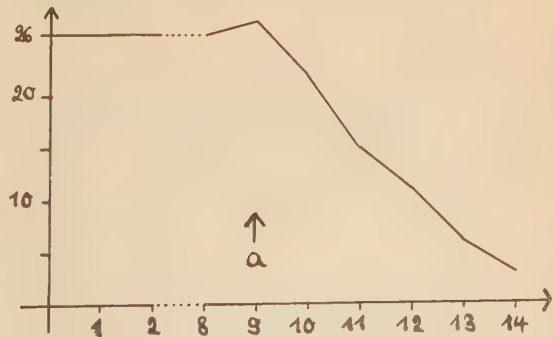
15 γ 150 γ

Versuch 5)

150 γ ergeben das gleiche Bild wie in Versuch 4), nämlich Herzstillstand in Systole und beträchtliche Verengung der Koronarien. (siehe Abb. 21)

Abb. 21)

α -Toxin am Rattenherzen.
Ordinate: Tropfenzahl;
Abszisse: Zeit in Minuten.
a = 150 γ



Die Wirkung von ∇ -Toxin wurde in 3 Versuchen geprüft.

Versuch 1)

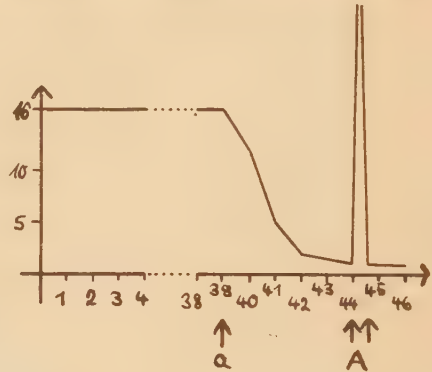
Während 0,3 und 3 γ ∇ -Toxin unwirksam bleiben, erzeugen 30 γ systolischen Herzstillstand, zuvor eine Periode mit vergrößerter Amplitude. Starke, schnell eintretende Kontraktion der Koronarien. Anschließend Druckerhöhung durchbricht die Wirkung auf die Kranzgefäße; der Muskel bleibt dabei unverändert in Kontraktur (vgl. Abb. 22).

Abb. 22)

∇ -Toxin am Rattenherzen.

Ordinate: Tropfenzahl;

Abszisse: Zeit in Minuten.



Versuch 2)

Nach 30 γ ∇ -Toxin ergibt sich dasselbe Bild wie in Versuch 1): systolischer Stillstand, der jedoch etwas langsamer eintritt. Vor der Abschwächung zweiminütige Periode mit größerer Amplitude. Starke Kontraktion der Koronarien (siehe Abb. 23).

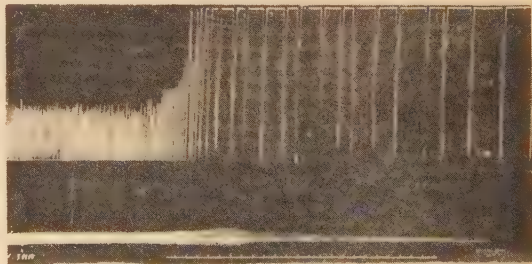
Abb. 23)

∇ -Toxin am Rattenherzen.

Obere Kurve: Koronardurchfluß; untere Kurve: Amplitude

des Herzschlages.

Zeitschreibung: 30 sec.



Versuch 3)

Hier läßt sich wegen der unregelmäßigen Tätigkeit keine definitive Wirkung von 0,3 - 3 γ ∇ -Toxin erkennen. Nach Applikation von 30 γ tritt systolischer Stillstand sowie starke Vasokonstriktion der Kranzgefäße ein (siehe Abb. 24).

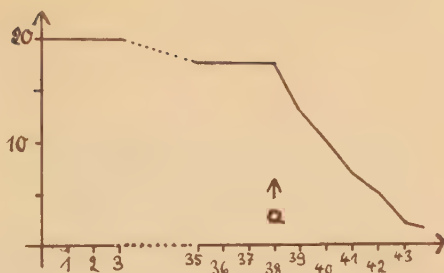
Abb. 24)

$\checkmark$ -Toxin am Rattenherzen.

Ordinate: Tropfenzahl;

Abszisse: Zeit in Minuten.

a = 30 γ .



Bei den Versuchen am Herzen wurde mit sauerstoffdurchperlter Perfusionslösung gearbeitet (siehe Methodik). $\checkmark$ -Toxin lag daher in der für seine Wirkung ungünstigen oxydierten Form vor. Wir strebten eine Wirkungsverstärkung durch Cysteinzusatz an, mußten aber zuvor untersuchen, wie das gegen Anoxie hochempfindliche Rattenherz auf Cysteinlösung reagiert.

Beim 1. Versuch kam es nach Applikation von Cystein 1/1000 in Uhlmann-Lösung zu plötzlichem Herzstillstand in Diastole, der durch 5,5 minütiges Auswaschen behoben werden konnte. Dieser Befund war am gleichen Herzen und an einem weiteren reproduzierbar. Am Koronardurchfluß war keine wesentliche Änderung zu beobachten. Wegen dieser starken Eigenwirkungen des Cysteins wurde von einer Aktivierung des $\checkmark$ -Toxins abgesehen.

Collagenase und Hyaluronidase (elektrophoretisch gereinigt):

0,15 - 15 Einheiten Collagenase waren bei einem Herzen ohne jeden Effekt auf Muskulatur und Gefäße. Ebenso wenig wirkte Hyaluronidase (150 Einheiten), auch bei wiederholter Applikation. Bei einem dritten Herzen waren 1,5 und 15 Hyaluronidase-Einheiten wirkungslos, nach 150 Einheiten blieb das Herz in Systole stehen, ohne daß der Koronardurchfluß sich änderte. Wir möchten jedoch annehmen, daß der Stillstand nicht auf das Enzym, sondern auf die hier überlange Versuchsdauer zurückzuführen ist.

BESPRECHUNG

Die vorliegenden Untersuchungen sollten klären, inwieweit bei der Vergiftung mit Gasbrandgift eine Kreislaufwirkung beteiligt sein könnte und welchem Giftbestandteil sie zuzuschreiben wäre.

Wir konnten an sämtlichen Objekten eine Kontraktur der Gefäß- bzw. Herzmuskulatur durch Gasbrandgift aufzeigen; hierfür sind α - und insbesondere β -Toxin, nicht aber Hyaluronidase und Collagenase verantwortlich. Damit passen unsere Resultate zu den an anderen Objekten gewonnenen (HABERMANN 2, 3).

Wir halten die Herz- und Gefäßwirkungen von α - und β -Toxin nicht für spezifische Kreislaufwirkungen, sondern möchten sie als Ausdruck einer allgemeinen Zellschädigung betrachten, für die etwa die Hämolyse ein anderes Beispiel ist. Die auf die Gewichtseinheit bezogen stärkere Wirkung vom β -Toxin besitzt ihre Parallele im hämolytischen Vermögen, das ebenfalls bei β -Toxin stärker ausgeprägt ist als beim α -Toxin.

Ob die beiden Toxine direkt an der Gefäßmuskulatur angreifen oder auf dem Umweg über eine Histaminfreisetzung, geht aus unseren Versuchen nicht hervor. Immerhin wurde nachgewiesen, daß α - und β -Toxin die Gewebsmastzellen des Rattenmesenteriums zerstören und aus dem isolierten Rattenzwerchfell eine durch Antihistaminika hemmbare Substanz freisetzen können (HABERMANN 3). Für eine intermediäre Histaminfreisetzung würde auch unser Befund sprechen, daß bei Perfusion der isolierten hinteren Körperhälfte der Ratte in der Durchströmungsflüssigkeit steigende Mengen Histamin nach Gesamtgift bzw. β -Toxin nachgewiesen werden können.

Ob die von uns beobachteten Wirkungen an isolierten Organen bei der Vergiftung des Gesamttieres eine Rolle spielen, erscheint unsicher, wenn nicht gar unwahrscheinlich. Zunächst sind die erforderlichen Toxin-konzentrationen so hoch, daß in Anwesenheit von Blut eine massive, mit dem Leben unvereinbare Hämolyse eintreten müßte. Ferner steht bei den Versuchen an isolierten Organen die Wirkung des β -Toxins im Vordergrund, am Gesamt-

tier tritt jedoch gerade diese Komponente stark zurück, was wohl auf die leicht eintretende oxydative Inaktivierung zurückgeführt werden kann. So müssen bei i. v. Injektion relativ hohe, akut wirkende Dosen zur Tötung von Mäusen appliziert werden. Bei subakuter Injektion konnte ein sicher durch $\mathcal{V}$ -Toxin bedingter Tod überhaupt nicht erzielt werden, und gerade dieser Vergiftungsweg dürfte der "natürlichen" Gasbrandvergiftung am ehesten entsprechen. Schließlich geht auch aus weiteren unveröffentlichten Versuchen hervor (HABERMANN), daß Gasbrandgesamtgift wie auch $\mathcal{V}$ -Toxin zwar den Katzenblutdruck bei i. v. Injektion kurzdauernd zu senken vermag, daß aber zum Zeitpunkt des Todes das Blut praktisch völlig hämolysiert ist. Es erscheint möglich, daß die akuten Kreislaufreaktionen auf plötzlicher Kaliumfreisetzung aus geschädigten Erythrozyten beruhen. Aus diesem Grund halten wir den akuten Tod nach Injektion von $\mathcal{V}$ -Toxin nicht für einen Herztod, wie dies ROTH und PILLEMER (2) auf Grund der Untersuchungen von BERNHEIMER und CANTONI am Froschherzen tun, sondern beziehen ihn auf akute intravitale Hämolyse.

Unsere Versuche an isolierten Organen sind jedoch kein einwandfreies Modell für die möglichen Wirkungen in vivo. So ist der Kontakt zwischen Gift und Organen bei den extrakorporalen Versuchen recht kurzdauernd, während bei der Gasbrandinfektion die Toxinkonzentration im Blut wenigstens über einige Zeit stationär sein dürfte. Nun kann aber am isolierten Froschherzen, das unter weitgehend konstanten Bedingungen auch bezüglich Toxinkonzentration arbeitet, der Wirkungseintritt nach α -Toxin mehrere Minuten auf sich warten lassen: In dieser Zeit ist das nicht fest gebundene Toxin aus den perfundierten Organen längst verschwunden. Möglicherweise ist also in vivo die Wirkung auf Herz und Gefäße stärker als es nach den in vitro durchgeführten Versuchen den Anschein hat. Im Vordergrund steht dort jedoch im akuten Versuch die Hämolyse. Die Verhältnisse im chronischen Experiment, bei der die intravaskuläre Hämolyse zurücktreten soll (MACFARLANE und MACLENNAN), lassen sich mit unseren Versuchen nicht vergleichen.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Der Durchfluß durch die isolierte hintere Körperhälfte des Frosches und durch das isolierte Kaninchenohr wird durch Gasbrandgesamtgift in der Regel vermindert, doch haben gelegentlich niedrige Konzentrationen eine Gefäßerweiterung zur Folge.

α - und β -Toxin wirken in ähnlicher Weise, während Hyaluronidase und Collagenase auch in hohen Konzentrationen unwirksam sind. Die Wirkung des β -Toxins wird durch Cysteinzusatz verstärkt.

2) Auch der Widerstand der isoliert durchströmten hinteren Körperhälfte der Ratte wird durch Gasbrandgesamtgift erhöht.

β -Toxin wirkt in unreduziertem Zustand relativ schwach; eine eindeutige Wirkung von α -Toxin ließ sich mit den verfügbaren Mengen nicht erzielen.

3) Am nach LANGENDORFF isoliert durchströmten Rattenherzen verengt Gasbrandgesamtgift die Koronarien und führt gleichzeitig zu systolischem Herzstillstand.

α - und β -Toxin wirken gleichartig, Hyaluronidase und Collagenase bleiben ohne Effekt.

Die Aktivität von Gasbrandgesamtgift an isoliert durchströmten Gefäßsystemen und Herzen ist dem darin enthaltenen α - und insbesondere β -Toxin zuzuschreiben, nicht dagegen den Enzymen Hyaluronidase und Collagenase.

Herrn Professor Dr. Dr. W. Neumann danke ich für die mir an seinem Institut gebotene Arbeitsmöglichkeit.

Herrn Privatdozenten Dr. E. Habermann danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für seine hilfsbereite Unterstützung und wertvollen Hinweise bei der Ausführung der Arbeit.



Böhlert DRUCK